

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
3 mai 2001 (03.05.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 01/31325 A1**

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup>:

**G01N 27/447**

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*): **JULLIEN, Ludovic** [FR/FR]; 77, rue de la Citadelle, F-94110 Arcueil (FR). **LEMARCHAND, Hervé** [FR/FR]; 45, avenue du Grand Orme, F-91360 Villemoisson sur Orge (FR). **LEMARCHAND, Annie** [FR/FR]; 45, avenue du Grand Orme, F-91360 Villemoisson sur Orge (FR).

(21) Numéro de la demande internationale:

PCT/FR00/02974

(22) Date de dépôt international:

25 octobre 2000 (25.10.2000)

(25) Langue de dépôt:

français

(74) Mandataires: **VAILLANT, Jeanne** etc.; Ernest Gutmann - Yves Plasseraud S.A., 3, rue Chauveau-Lagarde, F-75008 Paris (FR).

(26) Langue de publication:

français

(30) Données relatives à la priorité:

99/13366

26 octobre 1999 (26.10.1999)

FR

(81) États désignés (*national*): JP, US.

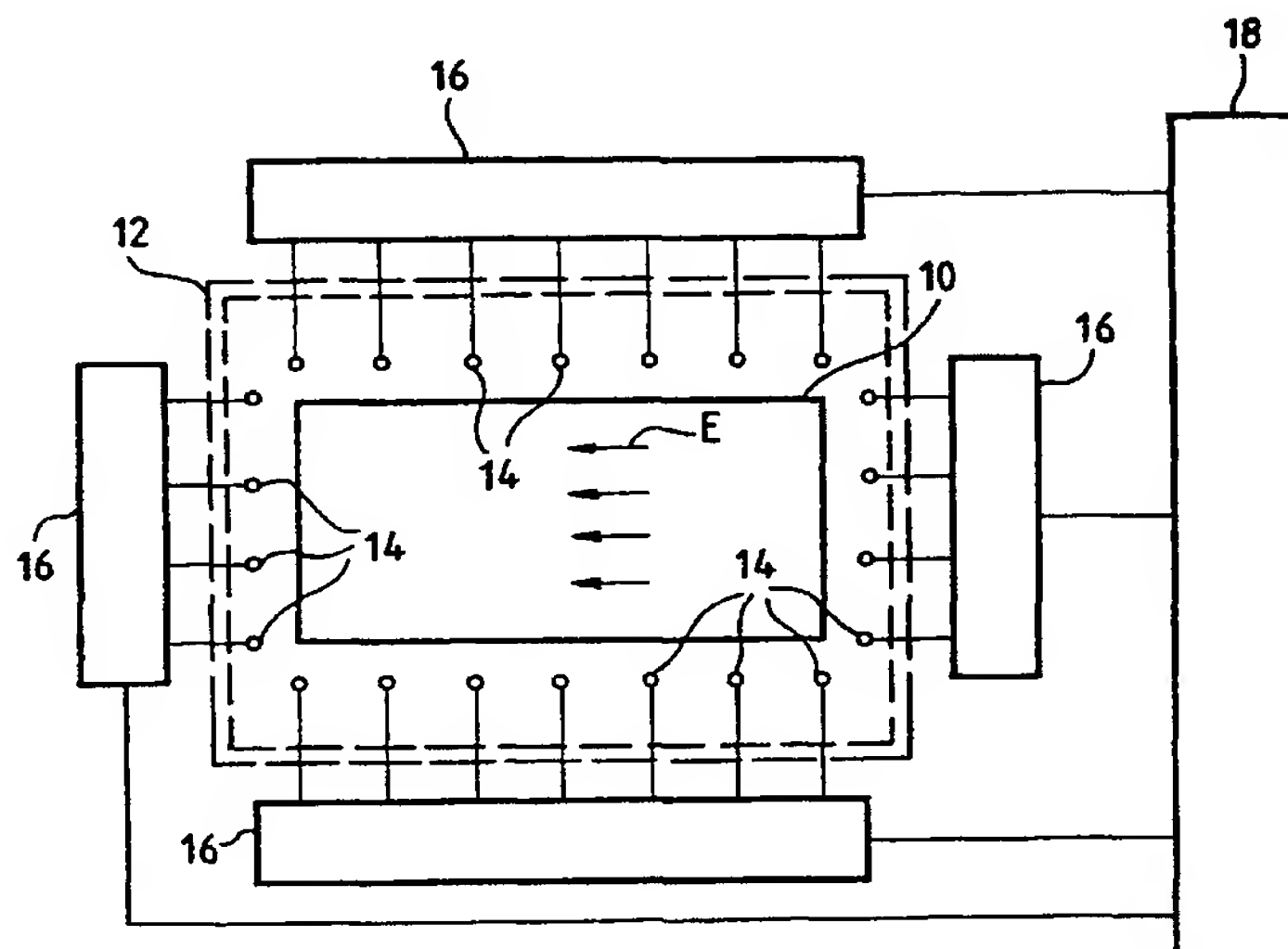
(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*): **CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE** [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris Cedex (FR).

(84) États désignés (*régional*): brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: METHOD FOR SEPARATING A CHEMICAL OR BIOLOGICAL COMPOUND IN A MIXTURE OF SIMILAR COMPOUNDS BY DIFFUSION IN A MEDIUM SUCH AS A GEL

(54) Titre: PROCEDE DE SEPARATION D'UN COMPOSE CHIMIQUE OU BIOLOGIQUE DANS UN MELANGE DE COMPOSES SIMILAIRES PAR DIFFUSION DANS UN MILIEU TEL QU'UN GEL



(57) Abstract: The invention concerns a method for separating a chemical or biological compound present in a mixture of similar compounds by diffusion in a gel containing a constituent (P) which reacts with the compounds of the mixture in reversible reactions having different kinetic constants from one compound to another. The method consists in applying to the medium (10) for example an electric field (E) varying periodically in time, the period of said field and the concentration of the reactive constituent in the medium (10) being based on the reaction kinetic components of the compounds to be separated to determine the conditions of resonance between said reactions and the applied field, for which the apparent diffusion coefficient of the compound in the medium is maximal.

[Suite sur la page suivante]

WO 01/31325 A1

**Publiée:**

- Avec rapport de recherche internationale.
- Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.

*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.*

---

**(57) Abrégé:** Procédé de séparation d'un composé chimique ou biologique présent dans un mélange de composés similaires par diffusion dans un gel contenant un composant (P) qui réagit avec les composés du mélange selon des réactions réversibles ayant des constantes cinétiques différentes d'un composé à l'autre, le procédé consistant à appliquer au milieu (10) un champ par exemple électrique (E) variant périodiquement dans le temps, la période de ce champ et la concentration du composant réactif dans le milieu (10) étant définies en fonction des composantes cinétiques de réaction du composé à séparer pour établir des conditions de résonance entre les réactions précitées et le champ appliqué, pour lesquelles le coefficient de diffusion apparent du composé dans le milieu est maximum.

**Procédé de séparation d'un composé chimique ou  
biologique dans un mélange de composés similaires par  
diffusion dans un milieu tel qu'un gel**

5 L'invention concerne un procédé de séparation  
d'un composé chimique ou biologique présent dans un  
mélange de composés similaires, par diffusion dans un  
milieu approprié tel qu'un gel.

10 Les méthodes connues de séparation d'un composé  
présent dans un mélange comprennent en général  
l'application d'une réaction chimique (au sens large)  
et/ou d'un ensemble de forces extérieures au mélange  
de composés. Par exemple, les chromatographies  
15 d'affinité permettent d'extraire d'un mélange les  
molécules les plus retenues ou les molécules les  
moins retenues vis-à-vis des sites d'interaction liés  
au support chromatographique, car ces molécules  
occupent des positions privilégiées, en tête et en  
queue d'élution. Toutefois, notamment quand le  
20 mélange contient une dizaine ou plus de composés  
similaires, il est difficile d'isoler des composés à  
affinité intermédiaire, très difficile d'isoler des  
composés à affinité quantitativement définie, et  
impossible de séparer des composés dont les affinités  
25 seraient identiques, mais qui auraient des constantes  
cinétiques d'interaction distinctes.

Le problème de la séparation de composés  
présents dans un mélange et ayant des constantes  
cinétiques d'interaction pour une cible donnée qui  
30 sont arbitrairement définies par un opérateur, se  
pose notamment dans le cadre du développement de  
nouveaux traitements thérapeutiques reposant sur  
l'optimisation de l'interaction de molécules avec des  
cibles d'intérêt biologique convenablement choisies  
35 (séquences génomiques, protéines, ...) et dans le

domaine de la chimie combinatoire, où les molécules testées sont souvent obtenues sous la forme de "mélanges contrôlés" de molécules similaires.

La présente invention a notamment pour but  
5 d'apporter à ce problème une solution simple, efficace et relativement facile à mettre en œuvre.

Elle propose à cet effet un procédé de  
séparation d'un composé chimique ou biologique dans  
10 un mélange de composés similaires, par diffusion dans un milieu tel qu'un gel, ce procédé comprenant une étape d'introduction du mélange de composés dans le milieu, caractérisé en ce qu'il consiste :

- à faire réagir dans le milieu les composés  $C_i$   
15 du mélange avec un composant  $P$  présent dans le milieu pour obtenir des produits  $Q_i$ , les réactions  $C_i + P \rightarrow Q_i$  étant réversibles et ayant des constantes cinétiques  $k_{1,i}$  dans le sens de l'obtention des produits  $Q_i$  et  $k_{2,i}$  dans le sens inverse, et

20 - à appliquer au milieu un champ variant périodiquement dans le temps et auquel les composés  $C_i$  sont sensibles, la période du champ et la concentration du composant  $P$  dans le milieu étant déterminées en fonction des constantes cinétiques  $k_1$ ,  
25  $k_2$  du composé  $C$  à séparer pour établir des conditions de résonance entre les réactions précitées et le champ, pour lesquelles le composé  $C$  a un coefficient de diffusion apparent dans le milieu qui est à une valeur maximale.

30 Selon l'invention, la connaissance des constantes cinétiques de réaction d'un composé  $C$  avec une cible, permet de déterminer une concentration de la cible dans le milieu et une périodicité du champ pour lesquelles le coefficient de diffusion apparent  
35 du composé sera maximal et largement supérieur aux

coefficients de diffusion apparents des autres composés, de sorte que ce composé sera séparé nettement des autres par diffusion dans le milieu.

5 Même lorsque les composés présents dans le mélange ont sensiblement le même comportement dans le milieu et ne diffèrent les uns des autres que par des constantes cinétiques d'interaction avec une cible préalablement définie, le procédé selon l'invention permet de définir une concentration de cible dans le milieu et une période du champ appliqué au milieu  
10 pour lesquelles le coefficient de diffusion apparent dans le milieu du composé à séparer est maximal par suite d'une résonance stochastique entre les réactions et le champ appliqué.

15 Par exemple, lorsque l'une des constantes cinétiques du composé C à séparer diffère de celles des autres composés du mélange d'un ordre de grandeur, les autres caractéristiques des composés étant identiques ou similaires, le coefficient de diffusion apparent du composé C dans le milieu est au  
20 moins 3,5 fois supérieur à celui des autres composés du mélange, ce qui permet non seulement de le séparer des autres composés par diffusion, mais également de l'extraire du milieu avec un rendement intéressant et  
25 un degré de pureté relativement élevé.

Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, le champ appliqué au milieu est un champ électrique et le procédé est mis en œuvre dans un dispositif classique d'électrophorèse, comprenant par  
30 exemple une cuve remplie d'électrolyte et dans laquelle est placée une plaque d'un gel approprié, et des électrodes disposées dans la cuve autour de la plaque de gel et reliées à des moyens d'alimentation électrique permettant d'appliquer un champ électrique

uniforme dans l'espace et variant périodiquement dans le temps à la plaque de gel.

Dans une variante, le champ précité est un champ de vitesses dans le milieu et le procédé est mis en œuvre dans un descriptif de chromatographie par exemple du type HPLC (High Performance Liquid Chromatography) dans lequel un champ de vitesses homogène d'un fluide porteur inerte est créé dans le milieu au moyen d'une ou de deux pompes.

L'invention sera mieux comprise et d'autres caractéristiques, détails et avantages de celle-ci apparaîtront plus clairement à la lecture de la description qui suit, faite à titre d'exemple en référence aux dessins annexés dans lesquels :

- la figure 1 représente schématiquement des moyens de mise en œuvre de l'invention dans le mode de réalisation préféré où le champ appliqué au milieu est un champ électrique ;

- la figure 2 est un graphe représentant les variations du rapport des coefficients de diffusion apparent et intrinsèque d'un composé C en fonction d'un paramètre A correspondant à l'amplitude du champ, dans les conditions de la résonance et dans des conditions différentes ;

- la figure 3 est un graphe représentant la variation du rapport des coefficients de diffusion apparent et intrinsèque en fonction des valeurs de paramètres correspondant aux constantes cinétiques de réaction du composé ;

- la figure 4 est un graphe représentant les variations de la pureté et du rendement dans le cas de la diffusion pure d'un mélange équimolaire de deux composés ayant des coefficients de diffusion différents, en fonction d'un paramètre sans dimension.



Dans la représentation schématique de la figure 1 qui concerne un mode de réalisation de l'invention dans lequel le procédé est mis en œuvre au moyen d'un dispositif d'électrophorèse, la référence 10 désigne une plaque d'un milieu tel que du gel, par exemple du gel d'agarose, d'un type utilisé couramment en électrophorèse.

La plaque de gel 10 est placée dans une cuve d'électrophorèse 12 dont le contour est indiqué en tirets, et dans laquelle sont disposées des rangées d'électrodes 14, formées par exemple par des fils électriquement conducteurs qui s'étendent perpendiculairement au plan du dessin.

Les électrodes 14 sont par exemple disposées autour des quatre côtés de la plaque de gel 10 et sont reliées à des circuits 16 d'alimentation électrique, eux-mêmes reliés à des moyens de commande 18 éventuellement pilotés par ordinateur.

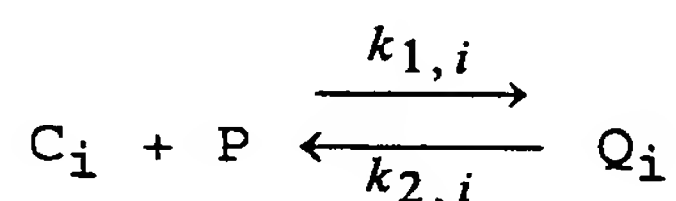
Ces moyens 16 d'alimentation et 18 de commande permettent d'appliquer à la plaque de gel 10 un champ électrique qui varie périodiquement dans le temps et qui est sensiblement uniforme dans l'espace, c'est-à-dire qui est le même en tout point de la plaque de gel 10, ce champ électrique étant par exemple orienté dans le plan de la plaque de gel, dans le sens indiqué par les flèches E.

Cette technique est connue en électrophorèse et décrite dans les documents WO 84/02001 et US 5 084 157 auxquels on pourra se reporter pour davantage de précisions.

Le procédé selon l'invention diffère des techniques connues d'électrophorèse essentiellement en ce que l'électrophorèse résultant de l'application d'un champ électrique périodique à un mélange de

composés, a lieu en milieu réactif et en ce que le champ électrique varie périodiquement autour d'une valeur moyenne nulle.

Selon l'invention, on utilise un milieu 10 qui contient une concentration déterminée d'un composant P qui réagit avec les composés contenus dans un mélange injecté en un point du milieu 10, les composés  $C_i$  de ce mélange réagissant avec le composant P pour former des produits  $Q_i$  qui se décomposent eux-mêmes en produits initiaux  $C_i$  et P, comme indiqué ci-dessous :



où  $k_{1,i}$  et  $k_{2,i}$  sont les constantes cinétiques des réactions dans un sens et dans le sens inverse et varient d'un composé  $C_i$  à l'autre,  $k_{1,i}$  étant un nombre de réactions par unité de concentration et par unité de temps,  $k_{2,i}$  étant un nombre de réactions par unité de temps.

Dans ce qui suit, on se place dans le cas le plus difficile où les composés  $C_i$  formant le mélange injecté dans le milieu 10 sont supposés avoir la même masse  $m$ , la même charge électrique  $z$ , le même coefficient de frottement  $\gamma$  dans le milieu et le même coefficient de diffusion  $D$  dans ce milieu. Le composant P présent dans le milieu 10 est supposé insensible au champ électrique et immobile ou pouvant diffuser faiblement dans le milieu 10, soit parce qu'il est fixé par covalence, soit parce que sa dimension restreint son déplacement dans le milieu 10. Les composés  $Q_i$  peuvent être mobiles à condition de présenter une réponse à l'action du champ distincte de celle des composés  $C_i$ .



On suppose également que la concentration du composant P est sensiblement uniforme dans le milieu 10 et est maintenue sensiblement constante dans ce milieu pendant toute la séparation.

5 Lorsque le champ électrique appliqué au milieu 10 est à variation sinusoïdale dans le temps et est par exemple de la forme  $E(t) = a \cos(\omega t)$ , on peut calculer la valeur moyenne  $\overline{x_c}(t)$  et la variance  $\sigma_c^2(t)$  de la position x du composé C le long d'un axe  
10 parallèle au champ électrique appliqué au milieu 10. On obtient alors la formule suivante :

$$\overline{x_c}(t) = \frac{A}{(c_1 + c_2)^2 + \omega^2} \left[ c_1(1 + \cos \omega t) + \frac{c_1 c_2 + c_2^2 + \omega^2}{\omega} \sin \omega t \right]$$

et de même :

$$\overline{x_Q}(t) = \frac{A}{(c_1 + c_2)^2 + \omega^2} \left[ c_1 + \frac{c_2}{\omega} ((c_1 + c_2) \sin \omega t - \omega \cos \omega t) \right]$$

où :  $A = \frac{za}{m\gamma}$  est une amplitude recalibrée du champ électrique,

20  $c_1 = k_1 p$ , p étant la concentration de P dans le milieu 10

$$c_2 = k_2$$

$c_1$  et  $c_2$  étant exprimés en  $s^{-1}$ .

25 Bien que le champ électrique appliqué soit nul en moyenne, la position moyenne des composés  $C_i$  et  $Q_i$  oscille autour d'une valeur différente de l'origine en raison de l'asymétrie des conditions initiales, le système gardant partiellement en mémoire la première  
30 excursion du champ électrique. Si on néglige les termes constants et les termes oscillants, et pour des P et des  $Q_i$  immobiles, la variance de position

associée aux distributions  $C_i(x,t)$  et  $Q_i(x,t)$  se réduit après un régime transitoire très court à :

$$\sigma_C^2(t) = \sigma_Q^2(t) = 2 D_a t$$

5 où  $D_a = \frac{c_2}{c_1 + c_2} \left[ D + A^2 \frac{c_1}{2((c_1 + c_2)^2 + \omega^2)} \right]$

$D_a$  étant le coefficient de diffusion apparent d'un couple  $C_i, Q_i$  et  $D$  étant le coefficient de diffusion intrinsèque du composé  $C_i$ .

10 Lorsque l'amplitude du champ électrique est suffisante pour que la relation ci-dessous soit satisfaite :

$$A \gg \frac{2D}{c_1} ((c_1 + c_2)^2 + \omega^2),$$

15

la diffusion apparente ne dépend pas de  $D$  et est commandée uniquement par les réactions chimiques et le champ électrique, le coefficient de diffusion apparent étant donné par la relation ci-dessous :

20

$$D_a = A^2 \frac{c_1 c_2}{2(c_1 + c_2)[(c_1 + c_2)^2 + \omega^2]}.$$

Dans ce cas, on a  $A = za/m\gamma$  lorsque les  $Q_i$  sont immobiles, ou  $A = za/m\gamma - z_Q a/m_Q\gamma_Q$  où  $z_Q$  est la charge portée par les  $Q_i$ ,  $m_Q$  la masse des  $Q_i$  et  $\gamma_Q$  le coefficient de friction des  $Q_i$  lorsque les  $Q_i$  sont mobiles.

25

Ce coefficient de diffusion apparent peut prendre une valeur arbitrairement grande définie par la valeur de l'amplitude recalibrée  $A$  du champ électrique.

30

Ce coefficient de diffusion apparent est une fonction de  $c_1$  et  $c_2$  et comprend un seul maximum (quand le champ électrique a une amplitude suffisante) qui est obtenu pour :

5

$$c_1^R = c_2^R = \omega/2$$

$$\text{ou, de façon équivalente, : } k_1^R \cdot p = k_2^R = \pi/T$$

10 où l'exposant  $R$  exprime une condition de résonance et  $T$  est la période du champ électrique.

En figure 2, la courbe en traits pleins indique la variation du rapport  $D_a/D$  en fonction de  $A$  à la résonance, la courbe en tirets longs indique la  
 15 variation de ce rapport en fonction de  $A$  pour des constantes cinétiques  $k_1^R$  et  $k_2^R/10$ , la courbe en tirets courts indique la variation de ce rapport en fonction de  $A$  pour des constantes cinétiques  $10k_1^R$ ,  $10k_2^R$ , et la courbe en pointillés indique la  
 20 variation de ce rapport pour des constantes cinétiques égales à  $10k_1^R$  et  $k_2^R$ .

La figure 3 représente la variation du rapport  $D_a/D$  en fonction des logarithmes à base 10 de  $c_1$  et  $c_2$ , le maximum de la variation correspondant aux  
 25 conditions de résonance précitées.

Si l'on considère les réactions chimiques comme des événements aléatoires, les transitions entre  $C_i$  et  $Q_i$  sont des événements stochastiques et le maximum de la valeur de  $D_a$  est obtenu pour des conditions qui  
 30 correspondent à une résonance stochastique entre les réactions chimiques et le champ électrique appliqué au milieu 10.

C'est cette résonance, qui se traduit par une valeur maximale du coefficient de diffusion apparent  
 35 d'un composé  $C$ , qui permet de séparer ce composé  $C$

des autres composants  $C_i$  présents dans le mélange. On peut calculer en particulier que, si l'une des constantes cinétiques d'un composé  $C_i$  est égale à la constante cinétique du composé  $C$  pour lequel il y a  
5 résonance et que l'autre constante cinétique du composé  $C_i$  diffère d'un facteur 10 de l'autre constante cinétique du composé  $C$ , le coefficient de diffusion apparent du composé  $C_i$  sera 3,5 fois plus faible environ que celui du composant  $C$ .

10 Cette différence de diffusion permet de bien séparer le composé  $C$  des composants  $C_i$  similaires, même lorsque ces derniers ont sensiblement la même charge électrique, la même masse et le même coefficient de frottement que  $C$ , ou bien sensiblement  
15 le même rapport  $z/m.\gamma$  que  $C$  (la valeur de  $A$  étant sensiblement la même pour tous ces composants) et diffèrent les uns des autres au moins par la valeur d'une constante cinétique de réaction avec le composant  $(P)$ .

20 Le champ électrique appliqué au milieu 10 peut varier périodiquement dans le temps d'une façon quelconque : la variation peut être sinusoïdale, en créneau, ou autre.

La plus grande diffusion du composé  $C$   
25 correspondant aux conditions de résonance permet de le séparer des autres composés  $C_i$  du mélange et de le récupérer, en partie, aux extrémités du profil de distribution dans le milieu 10. On peut dans le cas de la diffusion pure d'un mélange de deux composés  
30  $(C_1, C_2)$  ayant la même concentration et des coefficients de diffusion intrinsèques différents, calculer une pureté et un rendement de la récupération du composé  $C_1$  par les formules suivantes: